

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 加藤 優子

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻 循環制御医学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 益田 宗孝

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 竹居 光太郎

副査 横浜市立大学大学院医学研究科准教授 田村 功一

博士の学位論文審査結果の要旨

Epac1 Deficiency Attenuated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Formation

(Epac1欠損の血管平滑筋細胞の遊走および血管内膜肥厚形成に対する抑制効果)

血管平滑筋細胞の遊走により引き起こされる血管内膜肥厚は、経皮的冠動脈形成術後の再狭窄や動脈硬化などに関与する病態である。虚血性心疾患の治療では、経皮的冠動脈形成術が広くおこなわれているが、術後の過剰な血管内膜肥厚による血管再狭窄が問題となっている。本論文では、Epac1 欠損型マウスを用いて *in vitro* と *in vivo* の両面から、Epac1 の血管内膜肥厚に対する役割を総合的に検討し、Epac1 を中心とした血管傷害後の血管内膜肥厚形成の分子メカニズムを明らかにし、Epac1 の選択的阻害が血管内膜肥厚抑制のための新しい創薬治療法の開発の一助となる可能性を示した。

上記論文の研究内容説明に続き、以下のような質疑応答がなされた。

まず、田村副査から以下の質問があり、下記の回答がなされた。

1. Epac1 抑制とその上流のレセプターである EP4 の抑制とのメリットの違いは何か？

EP4 を抑制した場合、その下流である cAMP-PKA 経路と cAMP-Epac1 経路の両方が阻害される。cAMP-PKA 経路は生理的な恒常性をつかさどっているため、この経路の阻害は重大な副作用を引き起こす可能性がある。一方、cAMP-Epac1 経路は主に病的な状態でのみ活性化するため副作用が少ないことが予想される。

2. Epac1 の全身的な欠損マウスの作成により血圧、心血管機能、血管構造などにおいてフェノタイプはあるか？

Epac1 は病的な状態において活性化する分子のため通常の状態ではフェノタイプは見られていないが、炎症等病的な状態が起こった際に違いが出てくると推察される。

3. 細胞内のカルシウム動態が変化するが、血管の収縮機能は見ているか？

今回の研究では収縮に関する検討はおこなえていないため、今後の検討課題としたい。

次に、竹居副査から以下の質問があり、下記の回答がなされた。

1. トータルコフィリンの濃度をリファレンスとしているが、ウェスタンブロッティングの結果では野生型より Epac1 欠損型で高いのではないか？

トータルコフィリンは測定間の誤差が大きいため、実験を繰り返し行い、回数を重ねた結果で統計学的に評価をした。

2. 葉状仮足部でリン酸化コフィリンが脱リン酸化していると推察しているが、葉状仮

足にトータルコフィリンが存在しているという証拠はあるか？

抗トータルコフィリン抗体を用いた免疫染色にて、葉状仮足部分にトータルコフィリンの局在を確認した。加えて、脱リン酸化コフィリンが持つアクチンの脱重合の作用も F-アクチンを用いた免疫染色により葉状仮足部分で確認できた。

3. vivo の結果においても同様に、内膜肥厚部ではトータルコフィリンは存在しているがリン酸化コフィリン抗体では認識できなくなっていると考えて良いか？

内膜肥厚部の Epac1 欠損マウスの内膜肥厚部ではリン酸化コフィリンが発現したままであることから、in vitro の結果と合わせて野生型の内膜肥厚部では脱リン酸化が起きていると判断した。

4. 細胞内カルシウム上昇を直接的に阻害した場合にも今回と同様の結果が得られるのか？また siRap1a をかけてもカルシウム上昇は阻害されるか？

PDGF-BB 刺激下でのカルシウムの抑制は極性形成や細胞遊走を抑制するという既報がいくつかある。siRap1 でのカルシウム上昇の変化は確認できていないので今後の検討課題としたい。

5. Epac1 の阻害が有用とのことであるが、どういう方法で阻害するかという具体的なアイデアはあるか？

Epac1 の阻害剤は近年開発されたばかりで Epac1 の選択的阻害ははまだできない。良質な阻害剤の開発がなされれば部分投与だけでなく経口投与も副作用が少なくおこなえる可能性がある。現時点では、本研究にて明らかになったシグナル伝達経路にカルシニューリンが関与する可能性が高いことから、カルシニューリンの阻害剤であるシクロスポリンやタクロリムスといった免疫抑制剤を薬剤流出ステントに利用する方法が有用ではないか考えられ、すでに予備実験をおこなっている。

最後に益田主査から以下の質問があり、下記の回答がなされた。

1. 傷害1週目では中膜のコフィリンの脱リン酸化が Epac1 欠損マウスの方でより強く起こっているように見える。Epac1 欠損マウスでは炎症が抑制されているのではなく早期に終息するのではないか？

予備実験で、炎症に関与する SOCS3 や STAT3 の内膜肥厚部での発現をみた際、Epac1 欠損マウスでは炎症が進む結果が得られたことがあるが、確定には至っていない。Epac1 の欠損が内膜肥厚形成において早期から炎症を促進する可能性を考え、今後さらに検討を加えたい。

2. 骨髄移植実験の必要性に関して、骨髄由来細胞に特異的なマーカーを染色して観察する方法で良いのではないか？

予備実験で骨髄由来細胞に特異的な CD45 で内膜肥厚部を染色した結果、陽性細胞は数%にとどまったため、骨髄由来細胞の関与は小さいと考えられたが、骨髄由来細胞の

内膜肥厚への関与の程度は、議論が分かれて点であるため、今回は骨髄移植を用いて精査確認した。

3. 線維芽細胞と平滑筋細胞の内膜肥厚形成における貢献度はどちらが大きいのか？

今回の実験では検討していないが、他の報告では平滑筋細胞が肥厚の主体をなすといわれている。しかし、傷害の程度が大きくなるにつれ、他の部位からの動員が多くなるとの報告があることから、傷害の程度が大きい場合には線維芽細胞の貢献度が大きくなることが予想される。

4. 実験の貢献度は？

骨髄移植実験の一部において協力を得たものの、すべての実験において主体的に遂行した。

その他、いくつかの質問がなされたがいずれに対しても適切な回答がなされ、申請者がこの領域において深く正確に理解していることが伺えた。また、本研究は基礎から臨床へと発展する重要な研究であると考えられる。以上より、本申請は博士（医学）の学位を授与するに値すると総合的に判断された。